

# SENATO DELLA REPUBBLICA

————— XIV LEGISLATURA —————

**N. 343**

## **ATTO DEL GOVERNO**

### **SOTTOPOSTO A PARERE PARLAMENTARE**

Schema di decreto legislativo recante: «Attuazione della direttiva 2002/70/CE per la determinazione dei livelli di diossine e PCB diossina-simili nei mangimi»

*(Parere ai sensi dell'articolo 1, comma 3, della legge 3 febbraio 2003, n. 14)*

—————

**(Trasmesso alla Presidenza del Senato il 13 febbraio 2004)**

—————

**Schema di decreto legislativo per l'attuazione della direttiva 2002/70/CE che stabilisce i requisiti per la determinazione dei livelli di diossine e PCB diossina-simili nei mangimi.**

### *RELAZIONE ILLUSTRATIVA*

Il presente provvedimento è stato predisposto in base alla delega concessa dalla legge 3 febbraio 2003, n. 14 (legge comunitaria 2002), e, in particolare, in base all'articolo 1, comma 1, che prevede la delega ad emanare i decreti legislativi recanti le norme occorrenti per dare attuazione alle direttive comprese negli elenchi allegati ~~a~~ all'allegato B, che prevede, appunto, che sul provvedimento debbano essere acquisiti i pareri delle Commissioni parlamentari.

Con il presente decreto legislativo si vuole dare attuazione alla direttiva 2002/70/CE della Commissione, del 26 luglio 2002, che stabilisce i requisiti per la determinazione dei livelli di diossine e PCB diossina - simili nei mangimi.

Per la mancata attuazione della direttiva, la Commissione europea ha inviato, in data 9 luglio 2003, un parere motivato ai sensi dell'articolo 226 del Trattato (procedura 2003/0378).

Il testo è stato coordinato a seguito di riunioni svoltesi presso il Dipartimento per le politiche comunitarie, nell'ambito della Commissione istituita ai sensi dell'articolo 19 della legge 16 aprile 1987, n. 183, sulla base dello schema predisposto dal Ministero della salute.

Il provvedimento si compone di quattro articoli e due allegati:

- l'articolo 1 stabilisce che i metodi per il prelevamento dei campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di diossina e di furani nonché alla determinazione dei livelli di PCB diossina-simili nei mangimi sono quelli descritti nell'allegato I;
- l'articolo 2 dispone che la preparazione dei campioni e dei metodi di analisi per il controllo ufficiale dei livelli di diossina e di furani nonché per la determinazione dei livelli di PCB diossina-simili nei mangimi deve rispettare i criteri descritti nell'allegato II;
- l'articolo 3 prevede che il riconoscimento dei laboratori nazionali che effettuano il controllo ufficiale sui mangimi previsto dal presente decreto debba avvenire in conformità a quanto previsto in sede comunitaria;
- con l'articolo 4, infine, viene prevista la natura sostitutiva e cedevole del presente decreto legislativo, in caso di adozione da parte delle regioni o province autonome di analogo provvedimento attuativo della direttiva 2002/70/CE.

Dall'applicazione del presente decreto non derivano nuovi o maggiori oneri, né minori entrate a carico del bilancio dello Stato, e, pertanto, non viene presentata la relazione tecnica prevista dall'articolo 11-ter, comma 2, della legge 5 agosto 1978, n. 468, e successive modificazioni.

- Visti gli articoli 76 e 87 della Costituzione;
- Visto l'articolo 117 della Costituzione ;
- Vista la legge 3 febbraio 2003, n. 14, e, in particolare, l'articolo 1 e l'allegato B;
- Vista la direttiva 2002/70/CE della Commissione, del 26 luglio 2002, che stabilisce i requisiti per la determinazione dei livelli di diossine e PCB diossina-simili nei mangimi;
- Vista la legge 15 febbraio 1963, n. 281, e successive modificazioni;
- Visto il decreto ministeriale 20 aprile 1978, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n.165 del 15 giugno 1978;
- Visto il regolamento emanato con decreto interministeriale 11 maggio 1998, n. 241;
- Visto il decreto ministeriale 21 maggio 1999, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n. 206 del 12 settembre 1999;
- Visto il regolamento 23 dicembre 2002, n. 317, e successive modifiche;
- Vista la deliberazione preliminare del Consiglio dei Ministri, adottata nella riunione del..... ;
- Acquisito il parere della Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato, le regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano;
- Acquisiti i pareri delle competenti Commissioni permanenti della Camera dei deputati e del Senato della Repubblica;
- Vista la deliberazione del Consiglio dei Ministri, adottata nella riunione del.....
- Sulla proposta del Ministro per le politiche comunitarie e del Ministro della salute, di concerto con i Ministri degli affari esteri, della giustizia, dell'economia e delle finanze, delle politiche agricole e forestali, dell'ambiente e della tutela del territorio e per gli affari regionali:

EMANA  
il seguente decreto legislativo

#### Art. 1.

1. I campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli di diossina e di furani nonché alla determinazione dei livelli di PCB diossina-simili nei mangimi sono prelevati secondo i metodi descritti nell'allegato I.

#### Art. 2

1. La preparazione dei campioni ed i metodi d'analisi per il controllo ufficiale dei livelli di diossina e di furani nonché la determinazione dei livelli di PCB diossina simili nei mangimi sono conformi ai criteri descritti nell'allegato II.

#### Art. 3

1. I laboratori che effettuano il controllo ufficiale dei livelli di diossine e dei livelli di PCB diossina simili nei mangimi devono essere accreditati in base alla norma ISO/IEC/17025:1999 da un organismo riconosciuto in conformità alla Guida ISO 58, che certifichi l'applicazione della garanzia della qualità dei metodi di analisi applicati.

#### Art. 4

1. In relazione a quanto disposto dall'articolo 117, quinto comma, della Costituzione, le norme del presente decreto, afferenti a materia di competenza legislativa delle regioni e delle province autonome di Trento e di Bolzano che non abbiano ancora provveduto al recepimento della direttiva 2002/70/CE, si applicano sino alla data di entrata in vigore della normativa di attuazione di ciascuna regione e provincia autonoma, adottata nel rispetto dei vincoli derivanti dall'ordinamento comunitario e, per gli aspetti che concernono materie di competenza concorrente, dei principi fondamentali desumibili dal presente decreto.

#### Art. 5

1. Dall'attuazione del presente decreto non derivano nuovi o maggiori oneri a carico della finanza pubblica.

## ALLEGATO I

(articolo 1)

### METODI DI CAMPIONAMENTO PER IL CONTROLLO UFFICIALE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E LA DETERMINAZIONE DI PCB DIOSSINA-SIMILI IN TALUNI MANGIMI

#### 1. Oggetto e campo d'applicazione

I campioni destinati al controllo ufficiale dei livelli del contenuto di diossine (PCDD/PCDF), nonché alla determinazione del contenuto di PCB diossina-simili (1) nei mangimi, sono prelevati secondo le disposizioni del decreto ministeriale 20 aprile 1978, pubblicato nella Gazzetta Ufficiale n.165 del 15 giugno 1978. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi delle partite o sottopartite da cui sono prelevati. Il rispetto dei livelli massimi fissati dal regolamento 23 dicembre 2002, n. 317, e successive modifiche, è stabilito in base ai livelli determinati nei campioni di laboratorio.

#### 2. Conformità della partita o della sottopartita alle specifiche

Il laboratorio di controllo procede a una doppia analisi del campione di laboratorio e calcola la media dei risultati, qualora il risultato ottenuto nella prima analisi ecceda il livello massimo o sia inferiore al livello massimo di un valore che non superi il 20 %. La partita è accettata se il risultato della prima analisi è al di sotto del livello massimo di un valore superiore al 20 % o, dove la doppia analisi è necessaria, se la media è conforme al corrispondente livello massimo indicato dal regolamento 23 dicembre 2002, n. 317, e successive modifiche.

(1) Tabella TEF per la valutazione dei rischi umani stabiliti dall'OMS sulla base delle conclusioni dell'incontro di Stoccolma del 15-18 giugno 1997 [Van den Berg et al., 1998, "Toxic Equivalency Factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for Humans and for Wildlife", Environmental Health Perspectives, vol. 106, n. 12 (December 1998), pp. 775-792].

Tabella TEF

Congenero	Valore TEF
<b>Policlorodibenzodiossina (PCDD)</b>	<b>1</b>
2,3,7,8-TCDD	1
1,2,3,7,8-PeCDD	1
1,2,3,4,7,8-HxCDD	10,1
1,2,3,6,7,8-HxCDD	10,1
1,2,3,7,8,9-HxCDD	10,1

1,2,3,4,6,7,8-HpCDD	0,01
OCDD	0,0001

**Dibenzofurani (PCDF)**

2,3,7,8-TCDF	0,1
1,2,3,7,8-PeCDF	0,05
2,3,4,7,8-PeCDF	0,5
1,2,3,4,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,7,8,9-HxCDF	0,1
1,3,4,6,7,8-HxCDF	0,1
1,2,3,4,6,7,8-HpCDF	0,01
1,2,3,4,7,8,9-HpCDF	0,01
OCDF	0,0001

*PCB diossina-simili Non orto PCB + Mono orto PCB*

**Non orto PCB**

PCB 77	0,0001
PCB 81	0,0001
PCB 126	0,1
PCB 169	0,01

**Mono orto PCB**

PCB 105	0,0001
PCB 114	0,0005
PCB 118	0,0001
PCB 123	0,0001
PCB 156	0,0005
PCB 157	0,0005
PCB 167	0,00001
PCB 189	0,0001

Abbreviazioni: "T" = tetra; "Pe" = penta; "Hx" = esa; "Hp" = epta; "O" = octa; "CDD" = clorodibenzodiossina; "DF" = clorodibenzofurano; "CB" = clorobifenile.

## ALLEGATO II

(articolo 2)

### PREPARAZIONE DEI CAMPIONI E SPECIFICHE PER I METODI D'ANALISI IMPIEGATI NEL CONTROLLO UFFICIALE DEI LIVELLI DI DIOSSINE (PCDD/PCDF) E NELLA DETERMINAZIONE DI PCB DIOSSINA-SIMILI IN TALUNI MANGIMI

#### 1. Finalità e campo d'applicazione

Queste specifiche si applicano all'analisi di materie prime e mangimi volta a determinare la presenza di diossine [policlorodibenzodiossine (PCDD) e policlorodibenzofurani (PCDF)] e difenili policlorurati diossina-simili (PCB).

Il controllo della presenza di diossine nei mangimi può essere effettuato mediante una strategia che preveda un metodo di screening per selezionare i campioni con livelli di diossine e di PCB diossina-simili superiori al livello massimo consentito o inferiori di un valore al di sotto del 30-40 %. Occorre poi determinare/confermare la concentrazione di diossine nei campioni con livelli significativi tramite un metodo di conferma.

I metodi di screening sono impiegati per rilevare la presenza di diossine e PCB diossina-simili ai livelli massimi consentiti. Essi sono dotati di una grande capacità di trattamento di campioni, il che consente di passare al vaglio un'elevata quantità di campioni per ricercare quelli che potrebbero rivelarsi positivi. Questi metodi sono specialmente concepiti in modo da evitare i falsi risultati negativi.

I metodi di conferma forniscono informazioni complete o complementari che consentono di individuare e quantificare in maniera inequivocabile le diossine e i PCB diossina-simili al livello massimo consentito.

#### 2. Contesto

Poiché i campioni ambientali e biologici (inclusi i campioni di materie prime/mangimi) generalmente contengono miscele complesse di diversi congeneri di diossine, per agevolare la valutazione dei rischi è stato elaborato il concetto di "fattori di tossicità equivalente" (TEF). I TEF consentono di esprimere concentrazioni di miscele di PCDD e PCDF sostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e, di recente, alcune forme di PCB non orto e orto clorosostituiti aventi proprietà simili a quelle delle diossine in equivalenti tossici (TE) di 2,3,7,8-TCDD (cfr. nota 1 dell'allegato I).

Le concentrazioni delle singole sostanze in un dato campione vengono dapprima moltiplicate per il corrispondente TEF e poi sommate per ottenere la concentrazione totale dei composti diossina-simili espressa in TE.

Per il calcolo del "limite superiore", si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale alla soglia di determinazione.

Per il calcolo del "limite inferiore", si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale a zero.

Per il calcolo del "valore intermedio", si suppone che il contributo al TE di ogni congenere non quantificato sia uguale alla metà della soglia di quantificazione.

### **3. Requisiti da applicare nella preparazione dei campioni per la garanzia della qualità.**

Si applicano le disposizioni generali sulla preparazione dei campioni destinati all'analisi indicate nell'allegato, punto 1, del decreto ministeriale 28 maggio 1982, pubblicato nel Supplemento Ordinario n. 6 alla Gazzetta Ufficiale n. 265 del 25 settembre 1982.

Occorre inoltre che siano rispettate le seguenti prescrizioni:

- i campioni devono essere conservati e trasportati in appositi contenitori di vetro, alluminio, polipropilene o polietilene, dopo avere rimosso ogni traccia di polvere di carta dal contenitore. Gli strumenti in vetro devono essere risciacquati con solventi previamente sottoposti a un controllo volto a determinare la presenza di diossine;
- occorre fare un'analisi in bianco, ovvero effettuare l'intera procedura analitica senza il campione;
- il peso del campione utilizzato per l'estrazione deve essere tale da rispondere ai requisiti relativi alla sensibilità del metodo.

### **4. Requisiti applicabili ai laboratori**

- I laboratori devono dimostrare la validità del metodo nell'intervallo di tolleranza del livello considerato, ad esempio, 0,5x, 1x e 2x il livello considerato, con un coefficiente di variazione accettabile per analisi ripetute. Per ulteriori informazioni sui criteri di validità, si veda il punto 5.
- Il limite di quantificazione per un metodo di conferma non deve essere superiore a un quinto del livello massimo consentito, per garantire coefficienti di variazione accettabili nell'intervallo di cui alla lettera a)..
- Si devono costantemente effettuare controlli in bianco ed esperimenti o analisi dei campioni di controllo con l'aggiunta di indicatori (di preferenza, se disponibile, materiale di riferimento certificato), quali misure interne di garanzia della qualità.
- La riuscita partecipazione a studi condotti in collaborazione con altri laboratori che valutano la competenza del laboratorio è il modo migliore per dimostrarne la perizia nell'ambito di analisi specifiche. Tuttavia, il buon esito della partecipazione a studi condotti con altri laboratori, ad esempio, su campioni di terreno o di acque residue, non dimostra necessariamente che il laboratorio sia altrettanto competente a trattare campioni di prodotti alimentari o mangimi, caratterizzati da livelli di contaminazione minori. È pertanto requisito imprescindibile la partecipazione regolare a studi condotti in collaborazione con altri laboratori sulla determinazione di diossina e di PCB diossina-simili nelle corrispondenti matrici di prodotti alimentari/mangimi.

### 5. Requisiti applicabili alle procedure d'analisi per le diossine e i PCB diossina-simili

Requisiti di base di validità delle procedure d'analisi:

- Elevata sensibilità e limiti di rilevabilità bassi. Per quanto concerne le PCDD e i PCDF, le quantità rilevabili devono essere dell'ordine del picogrammo di TE (10-12 g), data l'estrema tossicità di alcuni di questi composti. È noto che i PCB si presentano in quantità più elevate rispetto alle PCDD e ai PCDF. Per quanto concerne la maggior parte dei congeneri di PCB, una sensibilità dell'ordine del nanogrammo (10-9 g) è sufficiente. Tuttavia, per la determinazione dei congeneri più tossici di PCB diossina-simili (in particolare i congeneri non orto sostituiti) si deve ottenere la stessa sensibilità delle PCDD e dei PCDF.

- Alta selettività (specificità). Occorre distinguere le PCDD, i PCDF e i PCB diossina-simili da una moltitudine di altri composti che, estratti simultaneamente dal campione e suscettibili d'interferire, sono presenti in concentrazioni di molto superiori a quelle degli analiti da rilevare. Per quanto concerne i metodi di gascromatografia/spettrometria di massa (GC/MS), è necessario distinguere tra vari congeneri, in particolare tra quelli tossici (ad esempio, i diciassette PCDD e PCDF sostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e i PCB diossina-simili) e altri congeneri. Mediante biotest dovrebbe essere possibile determinare selettivamente i valori di TE, quale somma di PCDD, PCDF e PCB diossina-simili.

- Estrema accuratezza (esattezza e precisione). La determinazione deve fornire una stima valida ed affidabile della concentrazione reale presente in un campione. È necessario porre estrema cura (accuratezza della misurazione: grado di concordanza tra il risultato di una misurazione e il valore reale o assegnato del misurando) per evitare che i risultati dell'analisi di un campione siano respinti a causa della scarsa affidabilità della stima dei TE. L'accuratezza è la risultante di esattezza (differenza tra il valore medio misurato per un analita in un materiale certificato, espressa in percentuale di tale valore) e precisione (la precisione viene generalmente calcolata sotto forma di scarto-tipo; essa include la ripetibilità e la riproducibilità e indica il grado di concordanza tra i risultati ottenuti applicando ripetutamente la procedura sperimentale in determinate condizioni).

I metodi di screening possono comprendere biotest e metodi GC/MS, mentre i metodi di conferma sono costituiti dalla gascromatografia ad alta risoluzione e dalla spettrometria di massa ad alta risoluzione (HRGC/HRMS). Si devono osservare i seguenti criteri per il valore totale in TE:

	Metodi di screening	Metodi di conferma
Percentuale di falsi negativi	< 1 %	
Esattezza		- 20 % a + 20 %
CV (coefficiente di variazione)	< 30 %	< 15 %

### 6. Requisiti specifici applicabili ai metodi GC/MS a fini di screening o di conferma

- Quale primo passo dell'analisi per convalidarne la procedura, da effettuare, ad esempio, prima dell'estrazione, occorre aggiungere standard interni di PCDD/F clorosostituiti alle posizioni 2,3,7,8 e marcati con  $^{13}\text{C}$  (e standard interni di PCB diossina-simile marcati con  $^{13}\text{C}$ , se si devono determinare PCB diossina-simili). Va aggiunto almeno un congenere per ciascun gruppo omologo di PCDD/F da tetra a octaclorati (e almeno un congenere per ciascun gruppo omologo di PCB diossina-simile, se si devono determinare PCB diossina-simili) (in alternativa, è possibile aggiungere almeno un congenere per ciascuna funzione di registrazione di ioni selezionati tramite spettrografia di massa utilizzata per il controllo di PCDD/F e PCB diossina-simile). Si consiglia vivamente, soprattutto per i metodi di conferma, di utilizzare l'insieme dei diciassette standard interni di PCDD/F clorosostituiti alle posizioni 2,3,7,8 marcati con  $^{13}\text{C}$ , nonché la totalità dei dodici standard interni di PCB diossina-simile marcati con  $^{13}\text{C}$  (nel caso si debbano determinare PCB diossina-simili).

Vanno inoltre determinati i fattori di risposta relativa per quei congeneri ai quali non è stato aggiunto alcun analogo marcato con  $^{13}\text{C}$ , utilizzando soluzioni di taratura adeguate.

- Per i mangimi d'origine vegetale e per i mangimi d'origine animale con un contenuto di grasso inferiore al 10 %, l'aggiunta di standard interni prima dell'estrazione è obbligatoria. Per i mangimi d'origine animale con un contenuto di grasso superiore al 10 %, gli standard interni possono essere aggiunti o prima dell'estrazione o dopo l'estrazione del grasso. Occorre convalidare adeguatamente l'efficacia dell'estrazione, a seconda della fase in cui sono stati introdotti gli standard interni e del modo in cui i risultati sono riportati sulla base di un prodotto o del grasso.

- Prima dell'analisi GC/MS, occorre aggiungere 1 o 2 standard di recupero (surrogato).

- È necessario effettuare il controllo del recupero. Per i metodi di conferma, i recuperi dei singoli standard interni devono essere compresi tra il 60 % e il 120 %. Recuperi inferiori o superiori per singoli congeneri, in particolare alcune dibenzodiossine e alcuni dibenzofurani epta e octaclorati, sono accettabili, purché il loro contributo al valore TE non superi il 10 % del valore totale TE (tenendo conto unicamente di PCDD/F). Per quanto concerne i metodi di screening, i recuperi devono essere compresi tra il 30 % e il 140 %.

- È opportuno separare le diossine dai composti clorurati interferenti, quali i PCB e gli eteri clorurati di difenile, ricorrendo ad adeguate tecniche cromatografiche (di preferenza tramite una colonna di florisil, d'allumina e/o di carbone).

- La separazione gascromatografica degli isomeri deve essere adeguata (overlapping < 25 % tra 1,2,3,4,7,8-HxCDD e 1,2,3,6,7,8-HxCDD).

- Per la determinazione, si consiglia di fare riferimento al metodo "EPA Method 1613, Revision B: Tetra- through Octachlorinated Dioxins and Furans by Isotope Dilution HRGC-HRMS", o ad un altro metodo con criteri di rendimento equivalenti.

- La differenza tra il livello massimo e il livello minimo non deve essere superiore al 20 % per i mangimi con una contaminazione da diossina pari o superiore al livello massimo. Per i mangimi che presentano livelli di contaminazione di molto inferiori al livello massimo, la differenza può essere dell'ordine del 25-40 %.

## 7. Metodi d'analisi di screening

### 7.1. Introduzione

Il metodo di screening consente di applicare vari approcci analitici: un approccio puramente di screening e un approccio quantitativo.

#### Approccio di screening

La risposta dei campioni è confrontata con quella di un campione di riferimento al livello considerato. I campioni la cui risposta è inferiore a quella del campione di riferimento sono considerati negativi, mentre quelli con risposta superiore sono ritenuti positivi. Requisiti:

- In ogni serie di prove si devono includere un campione di riferimento e uno in bianco, estratti e analizzati allo stesso tempo e alle medesime condizioni. Il campione di riferimento deve presentare una risposta nettamente superiore a quella del bianco.

- Si devono includere campioni di riferimento supplementari con concentrazione pari a 0,5x e 2x il livello considerato, per dimostrare l'efficacia del test nell'intervallo considerato per il controllo del livello considerato:

- Qualora si analizzino altre matrici, occorre dimostrare la validità dei campioni di riferimento, utilizzando di preferenza campioni il cui livello di TE, stabilito tramite HRGC/HRMS, sia equivalente a quello del campione di riferimento o di un bianco arricchito.

- Poiché nei biotest non si possono utilizzare standard interni, i test di ripetibilità sono estremamente importanti per ottenere informazioni sullo scarto-tipo nell'ambito di una serie di test. Il coefficiente di variazione deve essere inferiore al 30 %.

- Per quanto concerne i biotest, occorre definire quali sono i composti-bersaglio, le potenziali interferenze e il valore massimo tollerato per il bianco.

#### Approccio quantitativo

L'approccio quantitativo comprende obbligatoriamente una serie di diluizioni-tipo, un processo di purificazione e di misurazione doppio o triplo, nonché analisi in bianco e controlli di recupero. Il risultato può essere espresso in TE, dando per scontato che i composti responsabili del segnale soddisfano il principio di TE. A tal fine, si può impiegare la TCDD (o una miscela-tipo di diossine/furani) per elaborare una curva di taratura che consenta di calcolare il livello di TE nell'estratto e, di conseguenza, nel campione. Tale risultato è poi corretto con il livello di TE calcolato per un campione in bianco (per tenere conto di impurezze derivanti dai solventi e dalle sostanze chimiche utilizzate) e per il recupero (quest'ultima quantità è calcolata a partire dal livello di TE in un campione di controllo qualità la cui concentrazione è equivalente a quella del livello massimo considerato). È fondamentale tener conto che una parte della perdita apparente del recupero può essere dovuta agli effetti della matrice e/o alle differenze tra i valori dei TEF nei biotest e i valori dei TEF ufficiali stabiliti dall'OMS.

#### 7.2. Requisiti per i metodi d'analisi utilizzati per lo screening

- Lo screening può essere effettuato tramite metodi d'analisi GC/MS e biotest. Ai metodi GC/MS si applicano le prescrizioni stabilite al punto 6. Prescrizioni specifiche sono stabilite al punto 7.3 per i biotest cellulari, e al punto 7.4 per i biotest realizzati con kit.

- Si devono fornire informazioni sul numero di risultati falsi positivi e falsi negativi di un'ampia serie di campioni al di sopra e al di sotto dei livelli massimi o dei valori delle soglie d'intervento,

raffrontati al contenuto di TE determinato tramite metodo analitico di conferma. La percentuale reale di falsi negativi deve essere inferiore all'1 %. Affinché il metodo di screening risulti vantaggioso, la percentuale di campioni falsi positivi deve essere sufficientemente bassa.

- I risultati positivi devono essere sempre convalidati tramite un metodo analitico di conferma (HRGC/HRMS). I campioni corrispondenti a una vasta gamma di TE devono inoltre essere confermati tramite HRGC/HRMS (circa 2-10 % dei campioni negativi). Si devono fornire dati sulle corrispondenze tra i risultati dei biotest e quelli della HRGC/HRMS.

### 7.3. Requisiti specifici per i biotest cellulari

- Quando si effettua un biotest, si deve utilizzare in ogni prova una serie di concentrazioni di riferimento di TCDD o una miscela di diossine/furani (curva di risposta con un  $R^2 > 0,95$  per una dose completa). Tuttavia, ai fini dello screening, si può utilizzare nell'analisi dei campioni a bassa concentrazione una curva dettagliata nei livelli bassi.

- Per i risultati del biotest in un intervallo di tempo costante, è opportuno usare una concentrazione di riferimento di TCDD (circa 3x il limite di determinazione) su un modulo di controllo della qualità. In alternativa, si può utilizzare la risposta relativa di un campione di riferimento paragonata a una curva di taratura di TCDD, dato che la risposta delle cellule può dipendere da molteplici fattori.

- Si raccomanda di compilare e verificare i grafici del controllo della qualità (QC) per ogni tipo di materiale di riferimento, per garantire che il risultato sia conforme alle linee guida indicate.

- L'induzione della diluizione utilizzata per il campione deve situarsi nella parte lineare della curva di risposta, in particolare per i calcoli quantitativi. I campioni che non rientrano nella parte lineare della curva di risposta devono essere diluiti e nuovamente analizzati. Si consiglia pertanto di analizzare almeno 3 diluizioni alla volta.

- Lo scarto percentuale-tipo non deve essere superiore al 15 % quando si effettua una determinazione tripla per ogni diluizione del campione, né superiore al 30 % fra tre esperimenti indipendenti.

- È possibile scegliere come limite di rilevamento un valore equivalente a 3 volte lo scarto-tipo della soluzione di solvente in bianco o della risposta di fondo. Un altro metodo consiste nell'applicare una risposta che sia superiore alla risposta di fondo (fattore d'induzione 5 volte il solvente in bianco) calcolata dalla curva di taratura del giorno. È possibile scegliere come limite di quantificazione un valore equivalente a 5-6 volte lo scarto-tipo della soluzione di solvente in bianco o della risposta di fondo oppure applicare una risposta che sia nettamente superiore alla risposta di fondo (fattore d'induzione 10 volte il solvente in bianco) calcolata dalla curva di taratura del giorno.

### 7.4. Requisiti specifici per i biotest effettuati con kit (1)

- Occorre seguire le istruzioni del fabbricante relative alla preparazione dei campioni e alle analisi.

- Il kit non deve essere utilizzato oltre la data di scadenza indicata.

- Non si devono utilizzare materiali o componenti previsti per altri kit.

- I kit vanno conservati e utilizzati alle temperature di conservazione e di impiego indicate.

- Il limite di rilevazione per gli immunodosaggi è pari alla somma della media e  $3x$  lo scarto tipo, basandosi su 10 analisi ripetute del bianco, diviso per il valore della pendenza dell'equazione di regressione lineare.

- È opportuno impiegare standard di riferimento per le prove di laboratorio, al fine di garantire che la risposta allo standard rientri in un intervallo di valori accettabile.

### 3. Comunicazione dei risultati

A condizione che il metodo d'analisi impiegato lo consenta, i risultati dell'analisi devono contenere i livelli dei singoli congeneri di PCDD/F e PCB, nonché essere indicati come limite inferiore, limite superiore e valore intermedio, onde fornire la maggior quantità di dati possibile e permettere così d'interpretare i risultati in base alle prescrizioni specifiche.

La relazione deve inoltre menzionare il contenuto lipidico del campione e il metodo impiegato per l'estrazione del grasso.

I recuperi dei singoli standard interni devono essere forniti se si situano al di fuori dell'intervallo menzionato al punto 6 e qualora eccedano il livello massimo; negli altri casi, dietro richiesta.

(1) I kit per biotest attualmente in commercio non hanno dato prove sufficienti di sensibilità e affidabilità, tali da poterli utilizzare per rilevare la presenza di diossine ai livelli richiesti nei campioni di prodotti alimentari e mangimi.